

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-93

(43)公開日 平成6年(1994)1月11日

(51)Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 P 21/08		8214-4B		
// A 6 1 K 39/395	A D U T	9284-4C		
C 1 2 N 5/20		8931-4B	C 1 2 N 15/ 00	C
		7236-4B	5/ 00	B

審査請求 未請求 請求項の数1(全 7 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願平4-221431	(71)出願人	000206956 大塚製薬株式会社 東京都千代田区神田司町2丁目9番地
(22)出願日	平成4年(1992)8月20日	(72)発明者	矢澤 伸 群馬県前橋市天川大島1407東前橋住宅RC 2-106
(31)優先権主張番号	特願平4-104681	(72)発明者	浅尾 高行 群馬県前橋市総社町植野342マルワハイツ 101号
(32)優先日	平4(1992)4月23日	(72)発明者	赤松 優 徳島県板野郡北島町中村字本須91三木マン ション2-406
(33)優先権主張国	日本(JP)	(74)代理人	弁理士 三枝 英二 (外4名) 最終頁に続く

(54)【発明の名称】 モノクローナル抗体

(57)【要約】

【構成】本発明は、L e<sup>b</sup>及びL e<sup>y</sup>の両者を認識し、L e<sup>a</sup>及びL e<sup>x</sup>とは反応しないことを特徴とするモノクローナル抗体を提供するものである。

【効果】本発明抗体は、例えばこれを免疫組織染色法に利用して、殊に大腸癌の組織染色において癌部と非癌部の染め分けを行ない得、陽性率も高く、従って、癌、特に大腸癌の診断及び／又はスクリーニングに極めて有効である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】  $L e^b$  及び  $L e^y$  の両者を認識し、 $L e^a$  及び  $L e^x$  とは反応しないことを特徴とするモノクローナル抗体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、腫瘍乃至癌（以下単に「癌」という）に関連する新規なモノクローナル抗体、殊に大腸癌に関連する新しいモノクローナル抗体に関する。

【0002】

【従来の技術及び課題】 本発明の目的は、新規なモノクローナル抗体、より詳しくは  $L e^b$ （ルイスb型抗原： $Fuc\alpha 1 \rightarrow 2Gal\beta 1 \rightarrow 3[Fuc\alpha 1 \rightarrow 4]GlcNAc$ ）及び  $L e^y$ （ルイスY： $Fuc\alpha 1 \rightarrow 2Gal\beta 1 \rightarrow 4[Fuc\alpha 1 \rightarrow 3]GlcNAc$ ）として特定される糖鎖構造（抗原）の両者を認識し、 $L e^a$ （ルイスa型抗原： $Gal\beta 1 \rightarrow 3[Fuc\alpha 1 \rightarrow 4]GlcNAc$ ）及び  $L e^x$ （ルイスX： $Gal\beta 1 \rightarrow 4[Fuc\alpha 1 \rightarrow 3]GlcNAc$ ）として特定される糖鎖構造（抗原）のいずれにも反応性を有しない新規なモノクローナル抗体を提供することにある。

【0003】

【課題を解決するための手段】 本発明者らは鋭意研究の結果、上記目的に合致するモノクローナル抗体を得るに成功し、ここに本発明を完成するに至った。

【0004】 即ち本発明によれば、 $L e^b$  及び  $L e^y$  の両者を認識し、 $L e^a$  及び  $L e^x$  とは反応しないことを特徴とするモノクローナル抗体が提供される。

【0005】 本明細書において、GalはD-ガラクトース残基を、FucはL-フコース残基を、またGlcNAcはN-アセチル-D-グルコサミン残基をそれぞれ示す。

【0006】 本発明モノクローナル抗体の製造につき詳述すれば、本発明抗体は  $L e^b$  及び  $L e^y$  を免疫抗原として製造することができる。かかる免疫抗原を利用する抗体の製造法は、一般的方法に従うことができる（例えば Hanfland, P., Chem. Phys. Lipids, 15, 105 (1975); Hanfland, P., Chem. Phys. Lipids, 10, 201 (1976); Koscielak, J., Eur. J. Biochem., 37, 214 (1978)等参照）。

【0007】 該方法は、より具体的には、例えば上記免疫抗原で免疫した哺乳動物の形質細胞（免疫細胞）と哺乳動物の形質細胞腫細胞との融合細胞(hybridoma)を作成し、これより所望の抗体を産生するクローンを選択し、該クローンを培養することにより実施できる。

【0008】 かくして得られる抗体は抗体産生ハイブリドマ培養上清あるいはマウス腹水を抗体溶液としてそのままで使用できるものであり、更には硫酸アンモニウム分画やイオン交換クロマトグラフィーあるいはプロテ

インAカラム等によるアフィニティクロマトグラフィーにより精製したのも抗体溶液として使用することも可能である。

【0009】 上記方法において用いられる免疫抗原としての  $L e^b$  及び  $L e^y$  としては、之等糖鎖構造自体、該糖鎖構造を有するオリゴ糖、糖脂質及び糖蛋白質等を使用でき、更に之等のいずれかを発現し得る細胞自体や該細胞からの抽出抗原等を使用することもできる。之等の内では、特に矢澤らの方法 [Immunol. Invest., 1990, 19 (4), 319-327] に従って、L-フコース特異性レクチンの親和性クロマトグラフィーにより調製された抗原が好ましいものとして例示できる。尚、之等の  $L e^b$  及び  $L e^y$  は公知の方法に従い調製することができ、また市販品としても入手可能である。更に、免疫抗原としては、上記各種の物質を適当なアジュバントと混合して利用することもできる。

【0010】 上記免疫抗原で免疫される哺乳動物としては、特に制限はないが、細胞融合に使用する形質細胞腫細胞との適合性を考慮して選択するのが好ましく、一般にはマウス、ラット等が有利に用いられる。

【0011】 免疫は一般的方法により、例えば上記免疫抗原を哺乳動物に静脈内、皮内、皮下、腹腔内注射等により投与することにより実施できる。

【0012】 上記免疫は、例えばマウスの場合、免疫抗原をリン酸緩衝化生理食塩水(PBS)や生理食塩水等で適当な濃度に希釈し、所望により通常のアジュバントと併用して、供試動物に2~14日毎に数回投与し、総投与量が100~500 $\mu$ g/マウス程度になるようにして実施するのが好ましい。最終免疫後、摘出した脾臓より所望の免疫細胞を収得できる。尚、上記アジュバントとしては百日咳ワクチン、完全又は不完全フロインドアジュバントあるいはアラムを用いるとよい。

【0013】 上記免疫細胞と融合される他方の親細胞としての哺乳動物の形質細胞腫細胞としては、既に公知の種々のもの、例えばP3/X63-Ag8(X63) (Nature, 256, 495-497 (1975))、P3/X63-Ag8. U1 (P3U1) (Current Topics in Microbiology and Immunology, 81, 1-7 (1978))、P3/NSI-1-Ag4-1(NS-1) (Eur. J. Immunol., 6, 511-519 (1976))、Sp2/0-Ag14(Sp2/0) (Nature, 276, 269-270 (1978))、F0 (J. Immuno. Meth., 35, 1-21 (1980))等や、ラットにおける210.RCY3.Agl.2.3.(Y3) (Nature, 277, 131-133, (1979))等の骨髓腫細胞等を使用できる。

【0014】 上記免疫細胞と形質細胞腫細胞との融合反応は、公知の方法、例えばマイルスタイン (Milstein) らの方法 (Method in Enzymology, 73, 3 (1981))等に従って行なうことができる。より具体的には上記融合反応は、通常の融合促進剤、例えばポリエチレングリコール(PEG)、センダイウイルス(HVJ)等の存在下に、通常の培地中で実施され、培地には更に融合効率を

高めるためにジメチルスルホキシド等の補助剤を必要に応じて添加することもできる。また、電気処理（電気融合）による方法等を適宜採用することもできる。免疫細胞と形質細胞腫細胞との使用比は、通常の方法と変わりなく、例えば形質細胞腫細胞に対して免疫細胞を約1～10倍程度用いるのが普通である。融合反応時の培地としては、形質細胞腫細胞の増殖に通常使用される各種のもの、例えばRPMI-1640培地、MEM培地、その他のこの種細胞培養に一般に利用されるものを例示でき、通常これら培地は牛胎児血清（FCS）等の血清補液を抜いておくのがよい。

【0015】融合は上記免疫細胞と形質細胞腫細胞との所定量を、上記培地内でよく混合し、予め37℃程度に加温したPEG溶液、例えば平均分子量1000～6000程度のものを、通常培地に約30～60w/v%程度で加えて混ぜ合わせるにより行なわれる。以後、適当な培地を逐次添加して遠心し、上清を除去する操作を繰り返すことにより所望のハイブリドーマが形成される。

【0016】得られる所望のハイブリドーマの分離は、通常の選別培地、例えばHAT培地（ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含む培地）で培養することにより行なわれる。該HAT培地での培養は、目的とするハイブリドーマ以外の細胞（未融合細胞等）が死滅するのに十分な時間、通常数日～数週間行なえばよい。かくして得られるハイブリドーマは、通常の限界希釈法により目的とする抗体の検索及び単クローン化に供される。

【0017】目的抗体産生株の検索は、例えばELISA法（Engvall, E., Meth. Enzymol., 70, 419-439 (1980)）、ブランク法、スポット法、凝集反応法、オクタロニー（Ouchterlony）法、ラジオイムノアッセイ（RIA）法等の一般に抗体の検出に用いられている種々の方法（「ハイブリドーマ法とモノクローナル抗体」、株式会社R&Dプランニング発行、第30～53頁、昭和57年3月5日）に従い実施でき、この検索には前記免疫抗原やLe<sup>a</sup>、Le<sup>x</sup>、之等の構造を有する同様の抗原等が利用できる。かくして得られる本発明のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、通常の培地で継代培養でき、また液体窒素中で長期保存できる。

【0018】上記ハイブリドーマからの本発明モノクローナル抗体の採取は、該ハイブリドーマを、常法に従って培養してその培養上清として得る方法やハイブリドーマをこれと適合性のある哺乳動物に投与して増殖させ、その腹水として得る方法が採用される。前者の方法は、高純度の抗体を得るのに適しており、後者の方法は、抗体の大量生産に適している。また上記のごとくして得られる抗体は、更に塩析、ゲル濾過法、アフィニティクロマトグラフィー等の通常的手段により精製できる。

【0019】かくして得られる本発明モノクローナル抗

体は、Le<sup>b</sup>及びLe<sup>y</sup>を認識し（之等と反応性を有する）、Le<sup>a</sup>及びLe<sup>x</sup>とは反応しないことにより特徴付けられる。

【0020】従って、本発明抗体の利用によれば、例えば免疫組織染色法、放射免疫測定法（RIA）、酵素免疫測定法（EIA）、凝集法等の通常の免疫学的手段により、高感度、高精度に且つ高い特異性をもってLe<sup>b</sup>及びLe<sup>y</sup>の両者抗原の存在乃至局在を簡易に測定することができる。殊に、本発明者らの知見によれば、かかるLe<sup>b</sup>及びLe<sup>y</sup>の両者に反応性を有し、Le<sup>a</sup>及びLe<sup>x</sup>とは反応しないタイプの抗体、特に本明細書に「抗体YB-2」として記載の抗体、を利用した免疫組織染色法によれば、該抗体が癌部に極めて高い特異性を有するという結果が得られている。殊に本発明抗体の利用によれば、上記大腸癌の組織染色において、癌部と非癌部の染め分けが非常に良好になされ、また陽性率も高いという結果が得られている。更に、本発明モノクローナル抗体の反応性は、大腸癌細胞の生物学的悪性度と強い相関が認められており、従って、該抗体は癌、特に大腸癌の診断及び又はスクリーニングに極めて有効であると認められる。尚、本発明によって提供されるかかる特定の抗体を利用した測定系の設定、改良乃至応用は当業者にとり自明である。

【0021】上記測定系において検体としては、大腸等の各種組織や、例えば血液、細胞組織液、リンパ液、胸水、腹水、羊水、胃液、尿、唾液、髄液、唾液等の各種体液等をいずれも利用できる。

【0022】

【発明の効果】本発明によれば癌細胞、殊に大腸癌に特異反応性を有する抗体が提供される。本発明抗体の利用によれば大腸癌患者等の血清診断、組織診断法、大腸癌組織等のイメージング法、大腸癌部位等への薬物のターゲティング法、大腸癌等の抗体による治療法等が提供される。

【0023】

【実施例】本発明を更に詳しく説明するため、以下に実施例を挙げるが本発明はこれらに限定されるものではない。

【0024】

【実施例1】モノクローナル抗体の製造

① ハイブリドーマの樹立

矢澤らの方法〔Immunol. Invest., 1990, 19 (4), 319-327〕に従って得られたヒト由来フコシル糖鎖抗原と、フロインド完全アジュバントとを等量混合し、BALB/cマウスに0.1mlずつ腹腔内注射して免疫し、4週及び8週後に追加注射して免疫した。

【0025】最終免疫から3日後、脾臓を摘出し、RPMI-1640粉末培地（ギブコ社製）1袋にピルビン酸ナトリウム110mg、L-グルタミン292mg、炭酸水素ナトリウム1.8g、硫酸カナマイシン（明治

製薬社製) 1/16 g 力価及び1N塩酸2mlを加えて蒸留水で1lに調整したもの(以下「RPMI培地」という)に1/9容量のウシ胎児血清(FBS:ギブコ社製)を加えた培地(以下「10%FBS-RPMI培地」という)中で上記脾臓をよくほぐし、 $8.4 \times 10^7$  個の脾細胞を得た。

【0026】上記脾細胞と抗体非結合型マウスミエローマ細胞X63-Ag8-653とを、オリとハーゼンバーグ(Oi and Herzenberg)の方法に従って、ポリエチレングリコールを用いて細胞融合させた。即ち、RPMI培地で洗浄した脾細胞浮遊液に、予め培養しておいた上記ミエローマ細胞1/4量( $3.2 \times 10^7$  個)の浮遊液を混合し、遠心後、沈殿細胞を37℃に加温した50%ポリエチレングリコール1000(半井化学社製)のRPMI培地溶液1mlを1分間かけて沈殿をほぐしながら徐々に加え、更に1分間穏やかに混ぜた後、RPMI培地10mlをゆっくりと加えた。細胞を遠心沈殿後、10%FBS-RPMI培地に浮遊させ、フィーダー細胞として4週齢のBALB/cマウスから取った胸腺細胞 $3 \times 10^8$  個を混合し、96穴平底マイクロテストプレート(ファルコン社製)に100μlずつ播き、37℃、5%CO<sub>2</sub>の条件で一夜培養した。

【0027】翌日、100×HAT(ギブコ社製)を10%FBS-RPMI培地に1/100容量加えた培地(以下「HAT培地」という)100μlを各ウェルに加えた。更に4日後に培地の半量をHAT培地と交換し、この操作を4日毎に繰り返して、ハイブリドーマ細胞を選出した。

【0028】上記融合後12日目及び13日目に培養上清のLe<sup>b</sup>及びLe<sup>y</sup>反応性を調べるによりスクリーニングを行ない、特に強い活性を示すウェルについて限界希釈法に従いクローニングを行なって、所望の抗体を産生する目的ハイブリドーマを樹立した。

## 【0029】② モノクローナル抗体の作成

上記①で得られた所望のハイブリドーマの一つであるクローンNo. YB-2(YB-2は、通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所に微工研菌寄第13044号(FERM P-13044)として寄託されている)を、10%FBS-RPMI培地に5%CO<sub>2</sub>条件下で、37℃にて96時間培養した。培養液を3000rpm、10分間遠心分離して、目的モノクローナル抗体YB-2を含む培養上清を得た。

【0030】かくして得られた抗体YB-2のクラスは、マウスタイパーキット(パイオラット社製)を用いて調べた結果、IgMであった。

## 【0031】

【実施例2】本発明抗体YB-2の反応性

① 第1表に記載の各糖鎖抗原(各糖鎖結合BSA:“Syntagen”、ケムバイオメド社製)を用いて、その0.1ng/ウェルを固相化したプレートに、前記本発明抗体YB-2の培養上清のD-PBS<sup>(-)</sup>10倍希釈液100μl/ウェルを加えて、室温で2時間振盪下に反応させた。0.05%ツイーン20のD-PBS<sup>(-)</sup>で洗浄後、パーオキシダーゼ標識抗マウスIgM抗体(anti mouse IgM-HRP溶液、ザイメット社製)の100μl/ウェルを加えて、同様に反応(室温、2時間、振盪下)させ、洗浄した。

【0032】発色液(オルトフェニレンジアミン(OPD)溶液)をウェル当り50μl加え、室温で30分間反応させた後、50μlの2N硫酸を加えて反応を停止させ、492nmの吸光度(OD<sub>492nm</sub>)を測定した。

【0033】結果を第1表に示す。

## 【0034】

【表1】

第 1 表

糖 鎖 抗 原		OD <sub>492 nm</sub>
Le <sup>c</sup>	Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3 GlcNAc	18
HタイプI	Fuc $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 2 Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3GlcNAc	43
Le <sup>a</sup>	Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3 { Fuc $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 4 } GlcNAc	24
Le <sup>b</sup>	Fuc $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 2 Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3 { Fuc $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 4 } GlcNAc	2115
N-アセチルラクトースアミン	Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4 GlcNAc	4.2
HタイプII	Fuc $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 2 Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4GlcNAc	2163
シリアルタイプII	NeuAc $\alpha$ 2 $\rightarrow$ 3 Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4GlcNAc	11
シリアルLe <sup>x</sup>	NeuAc $\alpha$ 2 $\rightarrow$ 3 Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4 { Fuc $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 3 } GlcNAc	35
Le <sup>x</sup>	Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4 { Fuc $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 3 } GlcNAc	28
Le <sup>y</sup>	Fuc $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 2 Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4 { Fuc $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 3 } GlcNAc	2160
i	Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4 GlcNAc $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3 Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4GlcNAc	6
Tn	GalNAc $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 0-Ser/Thr	58
Tn- $\beta$	GalNAc $\beta$ 1 $\rightarrow$ 0-Ser/Thr	34
シリアルTn	NeuAc $\alpha$ 2 $\rightarrow$ 6 GalNAc $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 0-Ser/Thr	9
T	Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3 GlcNAc $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 0-Ser/Thr	33
シリアルT	NeuAc $\alpha$ 2 $\rightarrow$ 3 Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3GlcNAc $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 0-Ser/Thr	15
HタイプIII	Fuc $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 2 Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3GalNAc $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 0-Ser/Thr	656
アミノCTH	GlcNAc $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3 Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4 Glc $\beta$	21
パラグロボシド	Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4GlcNAc $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3 Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4Glc	25
Bトリキリカライド	Gal $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 3 { Fuc $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 2 } Gal $\beta$	14

【0035】第1表より、本発明抗体YB-2は、Le<sup>b</sup>及びLe<sup>y</sup>並びにHタイプIIを認識し、Le<sup>a</sup>及びLe<sup>x</sup>を含む他の糖鎖抗原とは実質的に反応しないことが判る。

【0036】② 下記壁深達度別の大腸癌63例を対象として、本発明抗体YB-2を用いた免疫組織染色法を実施した。

【0037】m (粘膜内) : 14例

sm (粘膜下層) : 12例

pm (固有筋層) : 18例

ss (漿膜層) : 11例

s, si (漿膜外) : 8例

免疫組織染色法としてはABC法 (VECTASTAIN (登録商

標) ABC システム実験マニュアル1989 : フナコシ薬品社) を用いた。

【0038】即ち、パラフィン包埋ブロックより厚さ2 $\mu$ mの薄切切片を作成し、脱パラフィン後、0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 付加100%メタノールにて内因性ペルオキシダーゼを不活化した。次いで、正常ヤギ血清にて二次抗体由来の非特異反応をブロックした後、抗体YB-2 (10倍希釈) と約15時間冷所 (4℃) にて反応させた。PBSで洗浄後、二次抗体 (ビオチン化ヤギ抗マウスIgM抗体) と30分間反応させ、更に洗浄後、ABC試薬 (ベクター社製) と30分間反応させた。洗浄後、DABにて発色させ、ヘマトキシリンで核染色した後、脱水封入した。

【0039】染色度は、ハマダらの報告 [Cancer, 55: 136-141, 1985] に従い、陰性（染色度0）及び陽性（染色度1: Apical type、染色度2: Cytoplasmic type及び染色度3: Stromal type）として評価した。

【0040】得られた結果を、生存率、分化度、リンパ節転移、リンパ管侵襲、静脈侵襲及び深達度別に、順次第2表～第7表に示す。

【0041】また上記と同様にして、上記各症例の非癌部（正常組織）及び大腸腺腫の免疫組織染色した結果を、第8表及び第9表にまとめて示す。

【0042】

【表2】

第 2 表

染 色 度	生 存 率	
	生	死
0	5	0
1	3	0
2	11	1
3	17	13

【0043】

【表3】

第 3 表

染 色 度	分 化 度			
	高分化	中分化	低分化	粘液癌
0	3	1	0	0
1	2	2	0	0
2	9	2	0	0
3	13	15	1	2

【0044】

【表4】

第 4 表

染 色 度	リンパ節転移			
	N0	N1	N2	N3
0	4	0	0	0
1	4	0	0	0
2	9	3	0	2
3	15	12	3	1

【0045】

【表5】

第 5 表

染 色 度	リンパ管侵襲	
	ly (陰性)	ly (陽性)
0	3	0
1	2	1
2	7	4
3	14	15

【0046】

【表6】

第 6 表

染 色 度	静脈侵襲	
	V- (陰性)	V+ (陽性)
0	5	0
1	2	0
2	6	1
3	11	9

【0047】

【表7】

第 7 表

染 色 度	深 達 度				
	m	sm	pm	ss	s
0	3	2	0	0	0
1	3	1	1	0	1
2	5	5	2	4	0
3	3	4	15	7	7

【0048】

【表8】

第 8 表

染 色 度	大腸腺腫の異型度	
	grade 1+2	grade 3
陽 性	9	5
陰 性	11	1

【0049】

【表9】

第 9 表

染色度	組 織		
	正常	膵臓	癌
陽 性	3	14	58
陰 性	22	12	5

【0050】以上のように、本発明抗体YB-2による免疫染色の結果によれば、抗体YB-2は癌部に極めて高い特異性を有し、癌部と非癌部の染め分け性に優れており、その反応性が大腸癌細胞の生物学的悪性度と強く相関すると認められる。

【0051】かかる本発明抗体を用いた免疫組織染色法は、大腸癌における陽性率が極めて高く（正常組織との反応性が低く）、従って該方法は、大腸癌診断分野において極めて有用であることが明らかである。

【0052】③ 前記①に準じて、抗体YB-2の反応性を阻害実験により試験した。

【0053】即ち、0.1 $\mu$ g/ウエルの糖鎖抗原を固相化したウエルに12.5ng/ウエルのYB-2抗体及び各種濃度の阻害用糖鎖抗原を加えて、室温2時間振盪下に反応させた。洗浄後、前記と同様にパーオキシターゼ標識抗マウスIgM抗体を用いて固相化糖鎖抗原に

結合したYB-2抗体を測定した。

【0054】その結果、0.1 $\mu$ g/ウエルの固相化Le<sup>b</sup>に対するYB-2抗体の反応を50%阻害するのに必要な各糖鎖抗原の濃度は次のとおりであった。

【0055】

Le<sup>y</sup>: 0.32ng/ウエル (約1/300量)

Le<sup>b</sup>: 0.28 $\mu$ g/ウエル (ほぼ同等量)

HタイプII: 4.2 $\mu$ g/ウエル

HタイプIII: 1.1 $\mu$ g/ウエル

また、0.1 $\mu$ g/ウエルの固相化Le<sup>y</sup>に対するYB-2抗体の反応を50%阻害するのに必要な各糖鎖抗原の濃度は次のとおりであった。

【0056】Le<sup>y</sup>: 0.18 $\mu$ g/ウエル (ほぼ同等量)

Le<sup>b</sup>: 10 $\mu$ g/ウエル以上 (全く阻害がかからなかった)

HタイプII: 10 $\mu$ g/ウエル以上 (全く阻害がかからなかった)

HタイプIII: 10 $\mu$ g/ウエル以上 (全く阻害がかからなかった)

以上の結果によれば、YB-2抗体は、阻害実験ではLe<sup>y</sup>にほぼ特異的な反応性を示す、ユニークな特性を有する抗体であることが判る。

フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/06				
G 0 1 N 33/53	S	8310-2 J		
33/574	D	9015-2 J		
33/577	B	9015-2 J		
(C 1 2 P 21/08				
C 1 2 R 1:91)				

(72) 発明者 申 貞均

徳島県板野郡北島町新喜来字中竿40-20